

論 文 要 旨

Novel pathogenic mutations and copy number variations in the VPS13A gene in patients with chorea-acanthocytosis

有棘赤血球舞踏病患者における VPS13A 遺伝子の
新規疾患変異とコピー数変異

富安 昭之

【序論および目的】有棘赤血球舞踏病 (chorea-acanthocytosis; ChAc) は、主に常染色体劣性の遺伝型式をとる稀な遺伝性神経変性疾患である。その臨床表現型は Huntington 病類似の不随意運動と末梢血の有棘赤血球症を呈し、病理学的には脳の線条体の神経変性を特徴とする。最近、我々は ChAc の病因遺伝子 (Vacuolar protein, sorting 13A; *VPS13A*) の発見に成功し、遺伝子産物を chorein と命名した。*VPS13A* 遺伝子は、全長 244kb、cDNA でも 10kb を超える巨大な遺伝子である。先行報告では、ChAc の遺伝子変異は *VPS13A* 上に広く分布していたが、ヘテロ接合性に一つしか遺伝子変異が見つからないものが 16% あり、一部は常染色体優性の遺伝形式をとる可能性が想定されていた。今回我々は、直接塩基配列決定法では検出できなかった CNV (copy number variation) が病因遺伝子変異に含まれる可能性を考え、臨床的に ChAc と考えられた患者 35 名に対して直接塩基配列決定法に CNV 解析を加えて *VPS13A* 遺伝子変異解析を行った。

【材料および方法】患者 35 名の白血球から RNA 抽出/cDNA 合成あるいは gDNA を抽出し、それぞれ *VPS13A* の翻訳領域あるいは *VPS13A* 上の 73 個の Exon 及びそれらに隣接する領域に対して直接塩基配列決定法によって遺伝子変異を検索した。ヘテロ接合性に一つしか遺伝子変異がないものについては Taqman probe を用いた定量的 PCR 法とロングレンジ PCR 法によって CNV 解析を行った。また、タンパク質抽出用の検体が入手できた 16 名に対してはウェスタンブロット法による chorein 検出を合わせて行った。なお本研究は、鹿児島大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認を得た上で行った。

【結 果】今回の研究によって、2 種類の CNV を含め、20 種類の ChAc の新規遺伝子変異を見出した。直接塩基配列決定法の結果、*VPS13A* 遺伝子変異をホモ接合性もしくは複合ヘテロ接合性に有すものは 33 名であり、ヘテロ接合性の変異を一カ所にのみ有すものは 2 名であった。この 2 名の CNV 解析の結果、1 名に deletion、1 名に duplication を見出した。また上記患者 2 名を含む 16 名に対して行

ったウェスタンブロット法では全例について対照者にみられる全長 chorein は検出されておらず、遺伝子変異により正常 chorein が産生されていないことが示唆された。

【結論及び考察】 ChAc のなかには常染色体優性遺伝形式をとるものもあるとされていたが、従来までの直接塩基配列決定法による解析では今回我々が同定した病因 CNV 等が見逃されていた可能性が高い。また、遺伝子変異が同定できない場合、ChAc の分子的診断にはウェスタンブロット法による chorein 検出解析を併用する必要があることが示唆された。また日本における ChAc の遺伝子変異は一つの創始者由来のものだけではなく、de novo の変異も多いことが示された。CNV 発生機序については、いくつか提唱されているが、検出された CNV については、FosTes(fork stalling and template switching の略で、相同配列を介して DNA 複製の鋳型が切り替わる結果複雑な duplication や deletion が形成される機構)や NHEJ(non-homologous end joining の略で、非相同配列が繋がった結果 non-recurrent な deletion が形成される機構)などの機序が関与していることが示唆された。

(American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics
2011, Volume 156, Issue 5;620-631 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 151 号	学位申請者	富安 昭之
審査委員	主査	高嶋 博	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	熊本 一朗	副査 出雲 周二
	副査	橋口 照人	副査 久保田 龍二

Novel pathogenic mutations and copy number variations in the *VPS13A* gene in patients with chorea-acanthocytosis

(有棘赤血球舞踏病患者における *VPS13A* 遺伝子の新規疾患変異とコピー数変異)

(American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, Volume 156, Issue 5;620-631, July 2011)

有棘赤血球舞踏病 (chorea-acanthocytosis; ChAc) は、一般的に常染色体劣性の遺伝型式をとる稀な遺伝性神経変性疾患である。臨床的には Huntington 病のような不随意運動に加え、末梢血有棘赤血球症を呈し、病理学的には脳の線条体の神経変性を特徴とする。原因遺伝子は *VPS13A* であり、その産物タンパク質は chorein と呼ばれる。直接塩基配列決定法で遺伝子検索された先行報告では、*VPS13A* 遺伝子変異がヘテロ接合性に一つしか見つからない患者が 16% もおり、一部は常染色体優性の遺伝形式をとる可能性が想定されていた。そこで、学位申請者は、直接塩基配列決定法では検出困難な Copy number variation (CNV) が病因遺伝子変異に含まれる可能性を考え、臨床的に ChAc と診断された患者 35 名(そのうち日本人 22 名)に対して直接塩基配列決定法に CNV 解析を加えて *VPS13A* 遺伝子変異解析を行った。またウエスタンブロット法により ChAc 患者 16 名の赤血球膜画分における chorein の発現についても調べた。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 2 種類の新規 CNV を含め、20 種類の新規の *VPS13A* 遺伝子疾患変異を発見した。
- 2) リアルタイム PCR 法を中心に用いた *VPS13A* 遺伝子の網羅的な CNV 解析法により、直接塩基配列決定法では検出困難であった 2 種の CNV 変異を比較的容易に検出できた。
- 3) 35 名の ChAc 患者全員が疾患変異をホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性に有し、報告した全ての症例が常染色体劣性遺伝形式をとることが明らかとなった。
- 4) 新規 CNV を有した患者 2 名を含む 16 名に対して行ったウエスタンブロット法では全例について対照者に認める全長 chorein は検出されず、遺伝子変異により正常 chorein が産生されていないことが示唆された。
- 5) 日本における ChAc の遺伝子変異の約 60% は 2 種の変異対立遺伝子の創始者効果で説明可能であった。
- 6) 検出された *VPS13A* 遺伝子の CNV については、FosTes (fork stalling and template switching) や NHEJ (non-homologous end joining) などの機序の関与が示唆された。

世界的にも非常に稀な ChAc の 35 症例の遺伝子解析にあたって、直接塩基配列決定法に CNV 解析が加えられ、さらにはウエスタンブロット法によるタンパクの発現解析とも組み合わせられており、分子レベルの総合的解析が行われたといえる。その結果、数々の新規疾患変異が検出されたのみならず、これまでの手法では検出困難であった病因となる CNV の存在も証明され、ChAc は常染色体劣性遺伝形式をとることが改めて強く示唆されることになった。また日本人における特定の 2 種の変異の創始者効果の頻度や、*VPS13A* における CNV の発症機序について触れられたことも大変興味深い。本研究は世界で初めて *VPS13A* の CNV 解析を含めた総合的解析が行われ、ChAc の遺伝子診断においてその手法の有用性を示したものである。以上より、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 151 号		学位申請者	富安 昭之
審査委員	主査	高嶋 博	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	熊本 一朗	副査	出雲 周二
	副査	橋口 照人	副査	久保田 龍二

主査および副査の5名は、平成23年10月24日、学位申請者 富安 昭之 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ChAc は人種によりその頻度や症候に違いがあるのか。それとも全く同じなのか。

(回答) 頻度については、全世界でも300例ほどしか報告されていないChAc症例のうち、100例以上は日本人であり、日本人に多い。その理由の一つとしては創始者効果が考えられる。日本人以外の人種の頻度については不明で、人種による症候の違いも不明である。特に日本人に特徴的な症候の存在も示唆されなかった。

質問2) 世界各地の各施設から患者が集められているが、共同研究はどのような形で行われたのか。

(回答) 我々はこれまでに発表した文献や学会活動などを通じて、ChAcの原因遺伝子であるVPS13A遺伝子解析を行っている事を、幅広く公開している。各施設から紹介状等により、臨床的にChAcと診断された例の遺伝子的診断依頼がある。その後、所定の同意書への記入してもらい等やり取りをしたり、必要であれば臨床症状等をさらに情報収集したりした上で、送られた血液サンプルを解析し、出た結果を送り返している。このような形で‘共同研究’としている。

質問3) ChAc は日本に多いということだが、ブラジルの2名は日系人ではないのか。

(回答) ブラジル人2名に関する情報は不明であった。

質問4) 日本の症例の半分以上は創始者効果で説明がつくとのことだが、それ以外については創始者効果ではない可能性を考えなくてはならないのか。

(回答) 質問の通りと思われる。創始者効果で説明できる変異(Exon60-61delやExon37 4411C>T)以外の変異を有する症例は、創始者効果のみならず、例えばde novoの変異である可能性も含めて考える必要があると思われる。

質問5) ChAc の精神症状とHuntington病の精神症状との違いは何か。

(回答) 両者ともに、皮質下性の進行性認知機能障害や情動面の障害などを呈し、その程度も様々であるが、両者の精神症状の違いについては不明である。

質問6) ChAc の臨床所見について、CKの上昇についてはどの程度なのか。

(回答) 送られてきた症例のうち分かっている症例では、どのような状況で測定されたのかは不明であるが、300から6000IU/lまでの上昇を認めていた。

質問7) VPS13A 遺伝子の2種類の別々のヘテロ接合性のCNVが合わさって病因となり得るのか。従来の直接シーケンシング法をベースとした手法で遺伝子変異が見つからない場合はそのような可能性を考えてもよいのか。

(回答) 今回解析した範囲では見つからなかったが、直接シーケンシング法で遺伝子変異が見つからない場合は、ヘテロ接合性の病因となるCNVが複合的に合わさる症例は想定している。尚、その場合は、chorein解析を並行して行うことが必要と思われる。

質問8) 複合ヘテロ接合性の変異を持つとしている患者について、それぞれの変異が二つのアリルそれぞれに存在していることの証明はどのようにしているのか。

(回答) その点の証明は、厳密には家系での解析等が必要と思われるが、全員について行われていない。仮に、一つのアリルに二つの変異が存在していれば、もう一本のアリルからは正常なchoreinが産生され、ウエスタンブロットで検出される可能性があった。また、そのような場合、正常choreinが50%産生されることにより典型的なChAc症状は示さない可能性を考えた。しかし、本研究では「複合ヘテロ接合性」と表記した患者でもchoreinを認めない事、典型的なChAc症状を呈したことから、二つのアリルに変異がそれぞれ存在していると考えられる。

質問9) chorein は赤血球膜の分画に多く存在していると考えてもよいのか。異常なchoreinが膜にアンカー出来ない可能性も考えるべきなのか。

(回答) 今回実験に用いたのは赤血球膜だが、過去にChAc患者で全血を用いて、またChAcモデルマウスにおいては全脳や心臓、腎臓、精巣など各組織を用いてウエスタンブロットが行われた事がある。その結果、ChAc患者やChAcモデルマウスにおいて、一様にchoreinの発現は認めなかった。異常なchoreinが膜にアンカーできない可能性というよりは、遺伝子変異による産物がいずれかの段階で分解されている可能性を考えている。

最終試験の結果の要旨

質問 10) 抗 chorein 抗体の作成において、1816 から 1830 のアミノ酸の合成ペプチドを用いているが、この部位を合成ペプチドのデザインのターゲットとした根拠は何か。

(回答) 抗体を作成した当時は chorein の全体像がわかっていなかった。当時分かっている配列の中で N 端と考えられた領域の中で、親水性アミノ酸が連続しておりエピトープとなる可能性の高いことがコンピュータプログラムで予想される箇所を抗体作成部位とした。

質問 11) 論文の Table 1 をみると、患者によっては臨床症状にクエスチョンマークが使われている者もいる。臨床症状の決定はどのようにしたのか。

(回答) 各施設から、送られてきた紹介状等でのやり取りする上で、明らかになった臨床症状は Table 1 に表記している。しかし、それでも分からない点があったために、「?」で表記したものもある。

質問 12) 論文中の PT34 と PT35 は新規の CNV を有していた患者であるが、何か特徴的な臨床症状を呈してしていたか。

(回答) CNV を有したからといって特に特徴的な症状を示していた訳ではなかった。

質問 13) リアルタイム PCR の結果について、例えば PT34 においては、exon24-45 の値が 1.5 となっているが、1 本の遺伝子が正常でもう 1 本が duplicate していると考えなのか。PT35 についても 1 本は正常でもう 1 本は短くなっていると考えるのか。

(回答) 質問の通りと考える。ただ、リアルタイム PCR で duplication が疑われたとしても、例えば他の染色体上でコピーが存在するなどの可能性はあったために、その後続く PCR 法での Junction を確認した。

質問 14) Exon24-26 のヘテロ接合性の deletion を持つ PT35 における long range PCR の結果像において、deletion の短いバンドだけがしかかっているように見えるのはなぜか。

(回答) 画像上は正常と同じ高さのバンドは見えにくいですが、実際は見えている。これは PCR の原理において、どうしても短いバンドを増幅しやすいために、deletion による短いバンドと正常バンドの濃淡に差が出ると思われる。

質問 15) 抗 chorein 抗体は、chorein のおおよそ中央部をターゲットに作成してあるが、例えば N 末端で作ってみたい、抗体の位置による検出され方の違いは検討されたのか。

(回答) それは今回の実験ではしていないが、過去には別グループにより作成された事がある。しかし非特異的なバンドを検出してしまったために、利用できなかった。

質問 16) 今回検出された L67P というミスセンス変異を含めて、これまで数種類の報告があるが、それらについては、segregation されているのか。例えば家系での研究などにおいて、変異であることに矛盾がないなどの証明がされているのか。

(回答) 本研究を含めて、これまでのミスセンス変異の報告において、家系研究などによる segregation は行われていない。これまでの報告では他に遺伝子変異が見つからず、また、健常者の有価な数のアリルにも認めない、などの点から「変異」と断定されている。L67P については多数の変異予測プログラムも併用し、「変異」と考えている。

質問 17) Taqman probe を設定していない exon にとても長いリピートがあると検出できない可能性があると思われる点についてはどうか。

(回答) Taqman probe は一つ一つが高額であるために、Long range PCR で可能な限り代用したという側面がある。PCR では長い距離はかけにくいというデメリットもあるために、リピートの長さによっては検出困難となる可能性はあると思われる。また各 exon の Linkage Disequilibrium を HapMap で確認した。

質問 18) deletion や duplication は数 exon にまたがって存在するのが普通なのか。

(回答) これまでの報告された CNV は 9 種類であるが、全て数 exon にまたがって存在するものであり、現時点では「普通」と考えられる。

質問 19) この研究では VPS13A 遺伝子検査を各施設から依頼された結果、すべてが ChAc 患者であったが、ChAc ではなかった患者はいなかったのか。そのような患者は除外されているのか。

(回答) ChAc ではなかった患者も存在する。ただし、MacLeod 症候群や Huntington 病など鑑別診断が事前に十分になされていない症例あったために、そのような患者は除外している。

質問 20) この研究では患者においてすべて chorein は全く出ていなかったが、例えば変異の種類によっては十分にはタンパクが産生されない等して、軽い臨床表現型として現れるといった例はないのか。

(回答) 本研究でウエスタンブロットを行った ChAc 患者は遺伝子変異の種類によらず chorein の免疫反応を全く認めなかった。また「少しだけ chorein が産生されるような ChAc 患者」もいなかったために、臨床表現型との関連は不明である。しかし、ChAc の症状を示さないヘテロ接合性のキャリアについては研究があり、抑うつ症状などの部分症状を示す可能性は以前に指摘している。

質問 21) 例えばミスセンス変異を有する例でヘテロ接合性キャリアのような 50% のタンパクを有するような例ではうつなどの違う病気との関連が示唆されているが、ミスセンス変異などで 20% ほどのタンパクが検出されるような例はあるのか。

(回答) 別グループの研究によると、使用している抗体が我々とは異なるウエスタンブロット法にて ChAc 患者の chorein の免疫反応が調べられた。その結果、ミスセンス変異のみを有する ChAc 患者で、少量の chorein が検出されたという例があった。しかし、我々が行ったものとは条件が異なる上に、CNV 解析もされていなかったために、CNV を見落としている可能性も含めてその結果には疑問が残る。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。